



VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル

西森 敬^{1)*}, 内田 郁夫¹⁾, 田中 聖¹⁾, 西森 知子¹⁾, 今井 邦俊¹⁾, 柏崎 佳人²⁾,
村田 典久³⁾, 神間 清恵⁴⁾

(平成14年10月2日 受付)

Molecular Epidemiological Manual for *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Mycobacterium avium* using VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) Typing.

Kei NISHIMORI^{1)*}, Ikuo UCHIDA¹⁾, Kiyoshi TANAKA¹⁾, Tomoko NISHIMORI¹⁾,
Kunitoshi IMAI¹⁾, Yoshihito KASHIWAZAKI²⁾, Norihisa MURATA³⁾, & Kiyoe JINMA⁴⁾

VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の新しい分子疫学的解析法についてPCR法から系統発生の解析法までの実験操作法が記述されている。

緒言

Mycobacterium bovis (以下牛型結核菌) は主に牛の結核病を引き起こす抗酸菌であり, 人の結核(病)を引き起こす*Mycobacterium tuberculosis* (以下人型結核菌) とは生化学的性状の相違及び動物への病原性の相違で区別されるが分子生物学的には高いホモロジーを持っており, 同じ結核菌群に属している。また難治性の下痢を主徴とするヨーネ病の原因菌であるヨーネ菌は, 鳥の結核病, 豚の抗酸菌症及び人の非定型抗酸菌症の原因菌である*Mycobacterium avium* (以下鳥型結核菌) とホモロジーが高く, 鳥型結核菌の亜種として*Mycobacterium avium*

*subsp. paratuberculosis*と命名されている。

分子生物学的手法の発展により, 人型結核菌において標準化された国際基準を持つ手法としてIS6110-RFLP (3) が, ヨーネ菌において有効な疫学的解析手段としてIS900-RFLP (7) が用いられている。また, ヨーネ菌を含む鳥型結核菌においてはIS1245やIS1311が利用されている。しかし, これらの手法は特殊な機器や熟練を要する。さらに牛型結核菌においてIS6110-RFLPはIS6110を1~2コピーしか保有しないため, 1~23コピーと変化に富む人型結核菌に比べ, 疫学的な有効性は低い。これらの問題を解決するために新たな手法の開発が続けられている(2)。その中で縦列反復配列の反復数による型別であるVNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別はPCRと電気泳動で実行可能であり, 一般の検査室での実施を考えた時, 有望な分子疫学的解析法である。結核菌群を対象としたこの手法はFrothinghamら(4)及びSupplyら(6)のそれぞれ独自の縦列反復配列領域の研究から発展してきたが, 人型結核菌の全ゲノム配列が決定されたことにより, 新たな有用な縦列反復配列領域が報告され, さらに精度が高まることが期待されている(1,5)。他

- 1) 動物衛生研究所北海道支所
〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘四番地
- 2) ウルグアイ獣医研究所
- 3) 熊本県中央家畜保健衛生所
- 4) 北海道留萌家畜保健衛生所

* Corresponding author; Mailing address: Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, Hitsujigaoka-4, Sapporo, Hokkaido, 062-0045 Japan TEL: 011-851-5226 E-mail: kei@affrc.go.jp

表1 *Mycobacterium tuberculosis* complexのVNTR型別用プライマー

| VNTR領域名 | プライマー名 | シーケンス | 引用文献 |
|---------|-----------|------------------------------|------|
| TBTR-1 | ETR-A-R | 5: AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT | (4) |
| | ETR-A-L | 5: CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT | (4) |
| TBTR-2 | ETR-B-R | 5: GCGAACACCAGGACAGCATCATG | (4) |
| | ETR-B-L | 5: GGCATGCCGGTGATCGAGTGG | (4) |
| TBTR-3 | ETR-C-R | 5: GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG | (4) |
| | ETR-C-L | 5: GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG | (4) |
| TBTR-4 | ETR-D-R | 5: CAGGTCACAACGAGAGGAAGAGC | (4) |
| | ETR-D-L | 5: GCGGATCGGCCAGCGACTCCTC | (4) |
| TBTR-5 | ETR-E-R | 5: CTTGCGCGTCCGAAGAGAGCCTC | (4) |
| | ETR-E-L | 5: CGGAACGCTGGTCAACCACTAAG | (4) |
| TBTR-6 | ETR-F-R | 5: CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC | (4) |
| | ETR-F-L | 5: GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC | (4) |
| TBTR-7 | MIRU2-R | 5: TGGACTTGACGCAATGGACCAACT | (6) |
| | MIRU2-L | 5: TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT | (6) |
| TBTR-8 | MIRU10-R | 5: GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC | (6) |
| | MIRU10-L | 5: GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT | (6) |
| TBTR-9 | MIRU16-R | 5: TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA | (6) |
| | MIRU16-L | 5: CCCGTGTCAGCCCTGGTAC | (6) |
| TBTR-10 | MIRU20-3 | 5: CGGAGAGATGCCCTTCGAGT | |
| | MIRU20-4 | 5: CACTAACGGTGGCGGGTATG | |
| TBTR-11 | MIRU23-R | 5: CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC | (6) |
| | MIRU23-L | 5: CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT | (6) |
| TBTR-12 | MIRU24-3 | 5: GCTCCGTGCACAGCCAAACC | |
| | MIRU24-4 | 5: TGGGCGAGTTGAGCTCACAGAAC | |
| TBTR-13 | MIRU26-3 | 5: ACTGCCTCGCGGAATAGG | |
| | MIRU26-4 | 5: GGATAGGTCTACCGTCGAAATCTG | |
| TBTR-14 | MIRU27-3 | 5: CGACGGGGCATCTTCGATTG | |
| | MIRU27-4 | 5: GTTCACCGGGCAACGCATAG | |
| TBTR-15 | MIRU 39-R | 5: CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC | (6) |
| | MIRU 39-L | 5: CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT | (6) |
| TBTR-16 | MIRU 40-R | 5: GGGTTGCTGGATGACAACGTGT | (6) |
| | MIRU 40-L | 5: GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA | (6) |

方鳥型結核菌やヨーネ菌においては未完成であるが (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>), 我々は限られた鳥型結核菌の情報から16ヶ所のVNTR領域を検出し, VNTR型別法を開発中である。進行中のゲノムプロジェクトが完了すれば, さらに有用な縦列反復配列が見いだされる可能性がある。また, VNTR型別のデータは縦列反復配列の反復数という数値で表現されるため, データベース化が容易であり, 世界的なデータの相互利用が可能である。

本資料ではウレグアイ獣医強化計画及び熊本県中央家畜保健衛生所との共同研究の結果として得られた牛型結核菌

のVNTR型別の技術的経験と平成12~13年度の動物衛生研究所内プロジェクトによるヨーネ菌用VNTR型別法の開発経験を元に, 最新情報を加えて結核菌群及び鳥型結核菌のVNTR型別の実施マニュアルについて記載する。

試薬及び機器

1. インスタジーンマトリックス (InstaGene™ Purification Matrix (Bio-Rad Laboratories))
2. ディスポーザブルエーゼ。
3. スクリューキャップ1.5mlエッペンドルフ型チューブ。100 8分間の加熱に耐えられる材質と構造を有

表2 *Mycobacterium avium*のVNTR型別用プライマー

| VNTR領域名 | プライマー名 | シーケンス |
|---------|-----------|----------------------------|
| MATR-0 | MSPCR-310 | 5': TCGGCCAGCTTGATCTTCTC |
| | MSPCR-839 | 5': TCCGTAACCGTCAATTGTCCA |
| MATR-1 | TR165-1 | 5': GAACGTTGGGCCGAATGCGA |
| | TR165-2 | 5': GTGTCCGACCCCTCCCGTAA |
| MATR-2 | TR176-1 | 5': TTGAGCAGCTCGTAAAGCGT |
| | TR176-2 | 5': CGCGCTCAAGGAGATGGTTC |
| MATR-3 | TR232-1 | 5': CCAATCACACGGCACCATC |
| | TR232-2 | 5': TCCTCGACAATCAGCACACT |
| MATR-4 | TR65-1 | 5': GACAATGGCATGCCGATCCT |
| | TR65-2 | 5': CGCTACGGCCTTCTCCA TCT |
| MATR-5 | TR130-1 | 5': CTTGCAGCAGGACGATCAGG |
| | TR130-2 | 5': GTGGTCGAAGTCGCTGTTGG |
| MATR-6 | TR131-1 | 5': TCGCAGGAAACCAACCTCAA |
| | TR131-2 | 5': GCGTGA TCGACTCGAAGACC |
| MATR-7 | TR30-1 | 5': CCGAGGAAGAGACGAAACCC |
| | TR30-2 | 5': TCGTCACCCACAACATGCAG |
| MATR-8 | TR57-1 | 5': CAGGTCCAGGGCATGTTTCC |
| | TR57-2 | 5': TCCCGATAATCCGTTGCATGAC |
| MATR-9 | TR100-3 | 5': CTGTTGGAGCGCAGCCGTTT |
| | TR100-4 | 5': ACCCAGTCGTCGACGGTGTT |
| MATR-10 | TR124-1 | 5': CGCCTCTGAGCGACAACGAC |
| | TR124-2 | 5': CGATCCGGTACCCGAAGCCA |
| MATR-11 | TR43-1 | 5': TGGCTGCTGTTCAATTGGATG |
| | TR43-2 | 5': TCGTCGGTCAATTGCACCTT |
| MATR-12 | TR8-1 | 5': TGATGGCGACCACCGACAAGG |
| | TR8-2 | 5': TGGATGCGGCCGACCAACA |
| MATR-13 | TR91-1 | 5': CCTCGAAGGTGGCGGACTTG |
| | TR91-2 | 5': ACCAGGATGGTGCCCAAACC |
| MATR-14 | TR92-1 | 5': TGGTCGCCGCACACCTACT |
| | TR92-2 | 5': GCCCTTACTGGGCAGGTCCTTC |
| MATR-15 | TR93-1-1 | 5': GGAAGGCAGCAAGGTC AAC |
| | TR93-1-2 | 5': TCAGGTCCAGCGACAGCTTC |
| MATR-16 | TR93-2-1 | 5': GTGGTCAGCACCCGGAGAGT |
| | TR93-2-2 | 5': ACCACCGACTGCTCGACCTT |

するもの。

4. プライマー。結核菌群についてはFrothinghamらのETR及びSupplyらのMIRUの縦列反復配列領域を増幅するプライマーセットを用いる(4.6)。なお前者は6ヶ所、後者は12ヶ所であるが2ヶ所(ETR-DとMIRU4及びETR-EとMIRU31)が重複しているので、表1に示すように便宜上TBTR-1から16の一連番号を用いて整理している。鳥型結核菌(ヨネネ菌を含む)についてはMATR-0から16の17組の

プライマーセットを用いる。(表2)

5. Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences K.K.)。現在全プライマーセットにおいて同一の増幅条件で安定した増幅産物が得られている。そのほかの酵素では同様の結果の得られる条件が未検討である。
6. サーマルサイクラー。
7. アガロース。200bp~800bpの範囲で50bpの差が解析できること。NuSieve[®] 3:1 Agarose

(TAKARA)等の高品質の製品が好ましいが、2.5%LO-3(TAKARA)アガロースでも十分解析可能である。

8. TBE(Tris-Borate-EDTA) 0.089M, pH8.3~8.5)
9. 電気泳動装置(Mupidなど)

その他、PCRの実施とその増幅産物の解析に必要な材料及び消耗品。

方法

1. テンプレートDNA溶液の作製

- 1) インスタジーンマトリックス200 μ lをスクリュウキャップ1.5mlエペンドルフ型チューブに分注する。2~3mm径コロニー1~2個の量を目安としてコロニーをエーゼに取り、チューブ内でインスタジーンマトリックスのビーズにエーゼをなすりつけるようにして、均一な浮遊液を作成する。(結核菌の場合は各施設のバイオハザード対策のマニュアルに従う。この操作はエアゾル対策として安全キャビネット内で実施すべきである。)
- 2) ヒーティングブロック等を使って56 $^{\circ}$ C 15~30分処理後、10秒間のボルテックスによる撹拌を行い、100 $^{\circ}$ Cの沸騰水上で8分間加熱殺菌をするとともにDNAの抽出を行う。(沸騰水上に浮かべ、フタをする等の操作により、キャップ等に付着した細菌も死滅させること。ただし、処理時間が長くなるほど、長鎖の増幅産物のシグナルが減弱してゆく傾向が観察されている。従って処理時間は厳密に守り、すぐに取りだし放冷する。)
- 3) 10秒間のボルテックスによる撹拌後、12,000rpm3分間高速遠心してその上清をテンプレートDNAとする。すぐに使わない場合は-20 $^{\circ}$ Cに保存する。使用に際して、このステップを繰り返して上清を用いる。

2. PCR

- 1) 結核菌群と鳥型結核菌は1サンプルあたり16本、ヨーネ菌は17本のReady-To-Go PCR Beads入りPCR反応チューブを準備する。(多検体のヨーネ菌を検討する場合はMATR-0のみを用いてPCRを実施して、まずIS900の確認とテンプレートDNAの濃度を確認すると効率的である。)
- 2) プライマーセット毎に25 μ M濃度のプライマー1 μ lと蒸留水21 μ l(合計23 μ l)をチューブに入れ、テンプレートDNAを2 μ l追加してPCR反応液とする。(23 μ lの混合液を十分撹拌後、11.5 μ l



図1 PCR増幅産物のサイズの測定例。PCR反応終了後1 μ lを2.5%アガロースゲル電気泳動にて解析した。100bpラダーのマーカの泳動像と比較して、PCR増幅産物のサイズを推定した。レーン1, 10, 19, 24, 25, 30, 39, 48:100bpラダーマーカー。レーン2~9, 11~18, 20~23, 26~29, 31~38, 40~47:それぞれプライマーセットMATR-1, MATR-2, MATR-3, MATR-3, MATR-4, MATR-5にてターゲットDNAを増幅した。テンプレートDNAは各プライマーセットにおいてレーン番号の小さいほうから鳥型結核菌参照株A, 同B, 鳥型結核菌野外分離株1, 同2, 同3, 同4, 同5, 鳥型結核菌参照株Cの順である。得られたサイズから換算表(表3)にて縦列反復配列の反復数を求める。さらにこの値から各株のアリルプロファイルを求める(図2)。

| VNTR領域長 (MATR-1) | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| PCR産物 | 281 | 353 | 361 | 168 | 248 | 326 | 334 | 220 | 435 | 331 | + | + |
| 反復数 | 1 | 3 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | + | + |
| アリルプロファイル | 1 3 2 0 2 2 2 2 2 1 0 2 1 3 | | | | | | | | | | | |

図2 アリルプロファイルの作製。アガロース電気泳動によって得られたPCR増幅産物のサイズから換算表(表3)にて含まれる縦列反復配列の反復数を得る。これを順に並べたものを各株のアリルプロファイルとして分子疫学解析に用いる。図は鳥型結核菌の例である。

ずつにわけ、1 μ lのテンプレートDNAを加えても実施可能である。)

- 3) 95 $^{\circ}$ C 5分のプレヒーティング後、98 $^{\circ}$ C 10秒, 68 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 1分の増幅サイクルを36回実行する。
- 4) PCR反応終了後、1 μ lをアガロース電気泳動にて増幅産物のサイズを測定する(図1)。(2.5%LO-3あ

表3 得られたPCR増幅産物の測定値 (bp) より各VNTR領域において含まれる縦列反復配列 (TR:Tandem Repeat) の反復数を求める換算表

| VNTR領域名 | TRの サイズ ¹⁾ | 含まれるTRの反復数 ²⁾ : | | | | | | | | |
|---|--------------------------|----------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex | | | | | | | | | | |
| TBTR-1 | 75 | 195 | 270 | 345 | 420 | 495 | 570 ³⁾ | 645 | 720 | 795 |
| TBTR-2 | 57 | 121 | 178 | 235 | 292 | 349 | 406 | 463 | | |
| TBTR-3 | 58 | 44 | 102 | 160 | 218 | 276 | 334 | | | |
| TBTR-4 | 77 | 79 | 156 | 233 | 310 | 387 | 464 | 541 | | |
| TBTR-5 | 53 | 65 | 118 | 171 | 224 | 277 | 330 | 383 | | |
| TBTR-6 | 79 | 239 | 318 | 397 | 476 | | | | | |
| TBTR-7 | 53 | 402 | 455 | 508 | 561 | 614 | 667 | 720 | 773 | 826 |
| TBTR-8 | 53 | 484 | 537 | 590 | 643 | 696 | 749 | 802 | 855 | 908 |
| TBTR-9 | 53 | 565 | 618 | 671 | 724 | 777 | 830 | 883 | 936 | 989 |
| TBTR-10 | 77 | 182 | 259 | 336 | 413 | 490 | 567 | 644 | 721 | 798 |
| TBTR-11 | 53 | 555 | 608 | 661 | 714 | 767 | 820 | 873 | 926 | 979 |
| TBTR-12 | 52 | 311 | 363 | 415 | 467 | 519 | 571 | 623 | 675 | 727 |
| TBTR-13 | 51 | 61 | 112 | 163 | 214 | 265 | 316 | 367 | 418 | 469 |
| TBTR-14 | 53 | 144 | 197 | 250 | 303 | 356 | 409 | 462 | 515 | 568 |
| TBTR-15 | 55 | 536 | 591 | 646 | 701 | 756 | 811 | 866 | 921 | 976 |
| TBTR-16 | 54 | 354 | 408 | 462 | 516 | 570 | 624 | 678 | 732 | 786 |
| <i>Mycobacterium avium</i> | | | | | | | | | | |
| MATR-0 | 195 | | 335 ⁴⁾ | 530 | | | | | | |
| MATR-1 | 53 | 228 | 281 | 334 | 387 | 440 | 493 | 546 | 599 | 652 |
| MATR-2 | 53 | 194 | 247 | 300 | 353 | 406 | 459 | 512 | 565 | 618 |
| MATR-3 | 53 | 195 | 248 | 301 | 354 | 407 | 460 | 513 | 566 | 619 |
| MATR-4 | 53 | 168 | 221 | 274 | 327 | 380 | 433 | 486 | 539 | 592 |
| MATR-5 | 58 | 133 | 191 | 249 | 307 | 365 | 423 | 481 | 539 | 597 |
| MATR-6 | 58 | 210 | 268 | 326 | 384 | 442 | 500 | 558 | 616 | 674 |
| MATR-7 | 57 | 220 | 277 | 334 | 391 | 448 | 505 | 562 | 619 | 676 |
| MATR-8 | 57 | 106 | 163 | 220 | 277 | 334 | 391 | 448 | 505 | 562 |
| MATR-9 | 55 | 325 | 380 | 435 | 490 | 545 | 600 | 655 | 710 | 765 |
| MATR-10 | 55 | 176 | 231 | 286 | 341 | 396 | 451 | 506 | 561 | 616 |
| MATR-11 | 55 | 284 | 339 | 394 | 449 | 504 | 559 | 614 | 669 | 724 |
| MATR-12 | 57 | 371 | 428 | 485 | 542 | 599 | 656 | 713 | 770 | 827 |
| MATR-13 | 56 | 235 | 291 | 347 | 403 | 459 | 515 | 571 | 627 | 683 |
| MATR-14 | 58 | 215 | 273 | 331 | 389 | 447 | 505 | 563 | 621 | 679 |
| MATR-15 | 57 | 194 | 251 | 308 | 365 | 422 | 479 | 536 | 593 | 650 |
| MATR-16 | 59 | 241 | 300 | 359 | 418 | 477 | 536 | 595 | 654 | 713 |

1): 縦列反復する1単位の塩基数 (bp), TRのコンセンサス配列の長さ。

2): PCR増幅産物から推測されるTRの反復数。実際は整数値とならない。四捨五入した値。

3): **太字**, BCG (Japan) の実測値及び文献引用データ。

4): **太字**, ミネソタ大学ヨーネ菌ゲノムプロジェクトにおけるK-10株のデータ検索値

るいは3~4%NuSieveのアガロースゲルをTBEにて作製する。サンプルが多い場合は、ミューピットの25本コームなど検体処理用の泳動装置を用いて効率化をはかる。)

3. アリルプロファイルの作製

1) 各プライマーセットによる増幅産物サイズとその縦

列反復配列領域に存在する縦列反復配列反復数の対応表 (表3) から反復数の整数値を求める。(実際、反復数は整数値とはなっていない。表は四捨五入している。)

2) 結核菌群の場合はTBTR-1から16の順に、またヨーネ菌の場合はMATR-0から16の順に、また鳥型結核

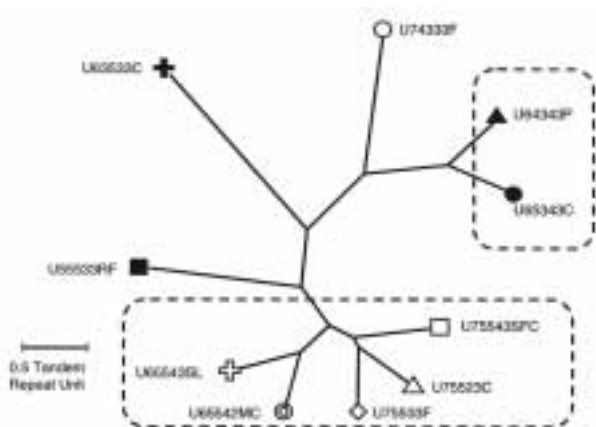


図3 系統樹解析例。用いた10種類のアリルプロファイルは牛型結核菌保存株を5種類のVNTR領域について解析した事例で得られたものである。株名の数字はアリルプロファイルを示す。各株間のマンハッタン距離を求め、距離行列を作製した(付記参照)。このデータからUPGMA法(PHYLIP)にて系統樹を推定し、TreeViewにて無根型樹形図を描写させた。図からも2つのグループが存在することが推測される。

菌の場合はMATR-1から16の順に反復数の整数値をならべ、この16個あるいは17個の数字の並びを被検株のアリルプロファイルとする。(図2)

4. 系統樹解析(‘系統発生疫学’)

- 1) 解析を実施する株間のすべての組み合わせで遺伝的距離を計算し、距離行列を求める。遺伝的距離はアリルプロファイルのそれぞれ対応する縦列反復配列数の差を累計するマンハッタン距離を用いる。(距離の求め方にはこのほかユークリッド距離, 平方ユークリッド距離, 質的距離などがあるが(8), 著者らはVNTRの解析ではマンハッタン距離が適切であると考えている。今後, さらに多くの例で推定された系統樹と分類及び疫学的データを比較して検証を続けて行く予定である。例数が多い場合は著者が作製したMicrosoft®Excelのマクロを利用すると比較的簡単に距離行列が得られる(付記参照)。
- 2) 市販及びフリーのプログラムパッケージを利用して, 距離行列法(UPGMA法あるいは近接結合法)にて系統樹を推定する。例数が少ない場合は形質状態法(最節約法あるいは最尤法)を使って網羅的に推定すると精度は高い。(最尤法では10サンプル位で検討する樹形が200万を超え, 限界に近いと言われている。コンピューターの性能向上とアルゴリズムの開発により改

良されているが限界がある(9)。著者らはPHYMLIP (Phylogeny Inference Package Version 3.57; <http://evolution.genetics.washington.edu/phymlip.html>)の距離行列法にて系統樹を推定している。

- 3) 系統樹データから系統樹描写プログラムにより有根型あるいは無根型の系統樹を作製し(図3), 分子疫学的解析を実施する。(著者らはTreeView; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>)を利用して描写している。

結語

VNTR型別はポストゲノムの分子疫学的手法とも考えられ, 各種病原体のゲノムが解析されるに伴って縦列反復配列領域の情報がMINISATELLITE DATABASE (<http://minisatellites.u-psud.fr/>)として整理されている。実際, 結核菌群のほかに, 炭疽やペストの分子疫学的解析でも利用されている(5)。ゲノム情報を利用した比較的導入しやすく, しかも必要菌量が少なく操作も簡単であるのでバイオハザード上も安全性の高い手法である。実際の応用にあたっては野外調査成績に系統樹解析結果を合わせて総合的に解析することにより, 家畜抗菌性疾患の防疫対策に貢献すると考える(2, 4, 5, 6)。

参考文献

1. Benson, G. 1999. Nucleic Acids Res 27:573.
2. Durr, P. A. et al. 2000. Rev Sci Tech 19:675.
3. van Embden, J.A. et al. 1993 J. Clin. Microbiol. 31:406.
4. Frothingham, R. et al. 1998. Microbiology 144:1189.
5. Le Fleche, P. et al. 2001. BMC Microbiol 1:2.
6. Mazars, E. et al. 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98:1901.
7. Pavlik, I. et al. 1999. J Microbiol Methods 38:155.
8. 三中信宏 著, 1997, 生物系統学, 東京大学出版会
9. 宮田隆 編, 1998, 分子進化 解析の技法とその応用, 共立出版

付記: 距離行列計算マクロ(Microsoft Excel用)

本マクロを実行するためのデータは「data」名のシートに入力する。B1のサンプル数に株数を、B2のタンデムの種類に使用したVNTR領域数を、B3に計算方法の番号(1:質的比較距離, 2:マンハッタン距離, 3:ユークリッド距離)を入力し、5行からプロファイルデ

ータを入力する。A列のサンプル名に株名を入力する。
 対応するアレルプロファイルをタンデムの種類に応じた
 数の列を使ってB列から入力する。「ツール」「マクロ」
 「マクロ」とプルダウンし、「マクロ」のウインドーでマ
 クロを実行すると別のシートに計算結果が出力される。

[dataシートの入力例]

| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |

[計算結果出力例 :

実施時間に応じて自動生成される「DM*****」シート]

| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| サンプル名 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |

[Visual Basicによるマクロプログラム]

Public Sub CALDM3()

```

Dim DM(100, 100) As Double
Dim sen As Integer
SM% = Worksheets("data").Cells(1, 2)
TR% = Worksheets("data").Cells(2, 2)
AN% = Worksheets("data").Cells(3, 2)
a = Now()

WSS$ = "DM" + Right(Year(a), 2) + Right(Month(a), 2) + Right(Day(a), 2) + Right(Hour(a), 2) + Right(Minute(a), 2)
Worksheets.Add.Name = WSS$
Worksheets(WSS$).Columns("B:DZ").ColumnWidth = 4
Worksheets(WSS$).Cells(1, 2) = SM%
Worksheets(WSS$).Cells(2, 2) = TR%
Worksheets(WSS$).Cells(3, 2).Select
Selection.Value = AN%
Selection.Interior.ColorIndex = AN% + 33
Worksheets(WSS$).Cells(3, Int(TR%) / 2 + 2).Select
Selection.Value = "T R ? : "
Selection.Interior.ColorIndex = 8
Worksheets(WSS$).Cells(3, TR% + 3).Select
Selection.Value = "距離行列"
Selection.Interior.ColorIndex = 39
Worksheets(WSS$).Cells(4, 1) = "サンプル名"
Worksheets(WSS$).Cells(1, 1) = Worksheets("data").Cells(1, 1)
Worksheets(WSS$).Cells(2, 1) = Worksheets("data").Cells(2, 1)
R = MsgBox(TR% & "種類のタンデムリピートの" & SM% & "サンプル

```

の" & AN% & "距離行列の計算を開始します!!" & Chr(12) & Chr(13) & "計算結果は" & WSS\$ & "のシートに保存されます。", 1 + 32, "タンデムリピート距離行列計算マクロ")

If R <> 2 Then

```

'データカラムの表示
For COL = 1 To TR%
Worksheets(WSS$).Cells(4, COL + 1).Select
Selection.Value = COL
Selection.Interior.ColorIndex = 8
Next COL

'データの読み込みと結果シートへの書き込み
For RW = 1 To SM%
Worksheets(WSS$).Cells(RW + 4, 1).Select
Selection.Value = Worksheets("data").Cells(RW + 4, 1)
Selection.Interior.ColorIndex = 8

For COL = 1 To TR%
DM(RW, COL) = Worksheets("data").Cells(RW + 4, COL + 1)
Worksheets(WSS$).Cells(RW + 4, COL + 1).Select
Selection.Value = DM(RW, COL)
Selection.Interior.ColorIndex = Int(DM(RW, COL)) + 2
Next COL

Worksheets(WSS$).Cells(RW + 4, TR% + 2).Select
Selection.Value = Worksheets("data").Cells(RW + 4, 1)
Selection.Interior.ColorIndex = 39
Selection.ColumnWidth = 10

```

Next RW

'遺伝距離の測定とデータの出力

```

For RW = 1 To SM%
For COL = 1 To TR%
DM(0, COL) = DM(RW, COL)
Next COL
Worksheets(WSS$).Cells(4, RW + TR% + 2).Select
Selection.Value = RW
Selection.Interior.ColorIndex = 39
Select Case AN%
Case 1 '変異Locus数の全Locus数に対する比率(質的距离)
For x = 1 To SM%
DM(x, 0) = 0
For Y = 1 To TR%
If DM(x, Y) <> DM(0, Y) Then DM(x, 0) = DM(x, 0) + 1
Next Y
DM(x, 0) = DM(x, 0) / TR%
DM(x, 0) = Int(DM(x, 0) * 1000 + 0.5) / 1000
Worksheets(WSS$).Cells(x + 4, RW + TR% + 2).Select
Selection.Value = DM(x, 0)
If x = RW Then
Selection.Interior.ColorIndex = 38
Else
Selection.Interior.ColorIndex = AN% + 33
End If
Next x
Case 2 'タンデム数の単純累計距離(マンハッタン距離)
For x = 1 To SM%
DM(x, 0) = 0
For Y = 1 To TR%
DM(x, 0) = DM(x, 0) + Abs(DM(x, Y) - DM(0, Y))
Next Y
Worksheets(WSS$).Cells(x + 4, RW + TR% + 2).Select
Selection.Value = DM(x, 0)
If x = RW Then
Selection.Interior.ColorIndex = 38

```

```

Else
    Selection.Interior.ColorIndex = AN% + 33
End If
Next x
Case 3 'タンデム数のユークリッド距離
For x = 1 To SM%
    DM(x, 0) = 0
    For Y = 1 To TR%
        DM(x, 0) = DM(x, 0) + (DM(x, Y) - DM(0, Y)) ^ 2
    Next Y
    DM(x, 0) = Sqr(DM(x, 0))
    DM(x, 0) = Int(DM(x, 0) * 100 + 0.5) / 100
    Worksheets(WSS).Cells(x + 4, RW + TR% + 2).Select
    Selection.Value = DM(x, 0)
    If x = RW Then
        Selection.Interior.ColorIndex = 38
    Else
        Selection.Interior.ColorIndex = AN% + 33
    End If
Next x
End Select
Next RW

MsgBox "タンデムリピートデータの距離行列の計算が終了しまし
た!!" & Chr(12) & Chr(13) & "計算結果は入力データの右側に出力され
ています。", 0 + 64, "タンデムリピート距離行列計算マクロ"

Else
    MsgBox "タンデムリピートデータの距離行列の計算マクロは実行せず
に終了しました!!", 0 + 16, "タンデムリピート距離行列計算マクロ"
End If
End Sub

```

Summary

Molecular Epidemiological Manual for *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Mycobacterium avium* using VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) Typing.

Kei NISHIMORI^{1)*}, Ikuo UCHIDA¹⁾, Kiyoshi TANAKA¹⁾, Tomoko NISHIMORI¹⁾,
Kunitoshi IMAI¹⁾, Yoshihito KASHIWAZAKI²⁾, Norihisa MURATA³⁾, & Kiyoe JINMA⁴⁾

In order to introduce the new molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* using VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) typing, laboratory protocols from PCR to phylogenetic analysis are described.